

**Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) –  
Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse  
Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-  
qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe***





## Daftar Isi

Daftar Isi .....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip umum .....	2
4 Peralatan .....	2
5 Bahan .....	3
6 Prosedur .....	3
7 Interpretasi hasil .....	7
8 Jaminan mutu pengujian .....	8
Bibliografi .....	9





## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) – Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 22 November 2012 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, perguruan tinggi, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK).
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Maret 2013 sampai 10 Mei 2013 dengan hasil akhir RASNI.



**Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) – Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe***

## 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) dengan metode *quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

## 2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

### 2.1

#### **amplifikasi**

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

### 2.2

#### ***annealing***

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

### 2.3

#### **C<sub>q</sub> (*quantification cycle*)/ C<sub>t</sub> (*cycle threshold*)/ C<sub>p</sub> (*crossing point*)**

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

### 2.4

#### **denaturasi**

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

### 2.5

#### **ekstensi**

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

### 2.6

#### ***hydrolysis probe***

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

### 2.7

#### **kontrol positif amplifikasi**

hasil transkripsi *in vitro* plasmid rekombinan yang mengandung fragmen gen virus

### 2.8

#### **kontrol negatif amplifikasi**

*nuclease-free water* yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji



**2.9**

**kontrol negatif ekstraksi**

hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water*

**2.10**

**kontrol positif ekstraksi**

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

**2.11**

***Limit of Detection (LOD)***

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

**2.12**

***primer***

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

**2.13**

***real-time PCR***

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

**2.14**

***Reverse Transcription (RT)***

proses pembentukan DNA komplemen dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

**2.15**

**standar positif**

plasmid yang mengandung cDNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

**2.16**

***template***

sekuen cDNA/RNA tertentu yang akan diamplifikasi

**3 Prinsip umum**

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan RNA dari organ target/ jaringan yang diduga terinfeksi IMNV, dilanjutkan dengan transkripsi balik untuk mensintesis cDNA yang seterusnya diamplifikasi secara *real-time*.

**4 Peralatan**

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- b) *freezer* (suhu -20°C atau lebih rendah);
- c) *heating block* atau *waterbath*;
- d) *laminar air flow*;
- e) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- f) *minimixer* ;
- g) pinset dan gunting;
- h) *rack ice block*;



- i) *refrigerated centrifuge*;
- j) *spindown centrifuge*;
- k) satu paket mesin *real-time* PCR.

## 5 Bahan

- a) *diethyl pyro carbonate* (DEPC) *treated water* atau *RNAse/ nuclease-free water*;
- b) *ethanol p.a*;
- c) kit ekstraksi RNA dengan metode *spin column*;
- d) larutan ekstraksi RNA komersial;
- e) *isopropanol* (2-propanol);
- f) kloroform;
- g) plasmid kontrol positif IMNV;
- h) *RNAse inhibitor*;
- i) larutan preservatif RNA;
- j) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl;
- k) *microtube* ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- l) *pellet pestle*/penggerus jaringan;
- m) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl ;
- n) sarung tangan (*powder-free*);
- o) masker;
- p) TN Buffer (20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl pH 7,4);
- q) Tris EDTA (TE) *buffer* (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7,5 );
- r)  $\beta$ -mercaptoethanol;
- s) kit *real-time* PCR komersial *compatible* dengan *TaqMan*<sup>®</sup> *probe*;
- t) *First Strand cDNA Synthesis Kit*;
- u) 1 set primer dan *probe*;
  - IMNV412F : 5'-GGA CCT ATC ATA CAT AGC GTT TGC A-3'.
  - IMNV545R : 5'-AAC CCA TAT CTA TTG TCG CTG GAT-3'.
  - IMNVp1 : 5'-6FAM-CCA CCT TTA CTT TCA ATA CTA CAT CAT CCC CGG-TAMRA-3'.

**CATATAN 1** bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

**CATATAN 2** bisa menggunakan primer dan *TaqMan*<sup>®</sup> *probe* lainnya yang sudah tervalidasi dan sudah diverifikasi di laboratorium

## 6 Prosedur

### 6.1 Persiapan Contoh Uji

- a. Telur, larva, dan *pasca larva*  
Contoh dapat diambil dari seluruh tubuh udang.
- b. Juvenil sampai dewasa  
Contoh dapat diambil dari bagian otot, jaringan ikat, hemosit, atau organ limfoid baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan gliserol dan *ethanol* absolut dengan perbandingan 20 : 80 atau *RNA latter*.



## 6.2 Ekstraksi RNA

### 6.2.1 Metode presipitasi

- Masukkan 2 mg – 5 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml.
- Tambahkan 500 µl larutan ekstraksi RNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pastle*.
- Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
- Tambahkan 100 µl kloroform.
- Tutup *microtube* dan kocok dengan *minimixer* selama 15 detik dan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit.
- Sentrifugasi contoh pada 12 000 rpm selama 15 menit.
- Pindahkan cairan lapisan paling atas (fase air) ke dalam *microtube* baru.
- Tambahkan isopropanol sebanyak 200 µl.
- Sentrifugasi pada 12 000 rpm selama 10 menit.
- Buang *isopropanol*, cuci *pellet* dengan 750 µl *ethanol* 75%, sentrifugasi pada 9 500 rpm selama 5 menit.
- Keringanginkan *pellet* RNA selama 10 menit.
- Larutkan *pellet* RNA dengan 100 µl DEPC water
- Ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi RNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi RNA} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- Lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- Periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ).
- Simpan larutan RNA pada -20°C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah dalam bentuk *aliquot*.

### 6.2.2 Metode Spin Column

- Masukkan 20 mg – 25 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml
- Tambahkan 400 µl *lysis/binding buffer* dan homogenkan
- Sentrifugasi pada 13 000 x g selama 2 menit
- Pindahkan cairan supernatan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru
- Tambahkan 200 µl *ethanol* 96%
- Pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan.
- Sentrifugasi pada 13 000 x g selama 30 detik.
- Pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*
- Masukkan 90 µl DNase *incubation buffer* (*white cap*) ke dalam *microtube* 1,5 ml steril dan tambahkan 10 µl larutan DNase I
- Masukkan campuran larutan no. i) ke dalam *filter tube*
- Inkubasikan selama 15 menit pada suhu 15 °C – 25 °C
- Tambahkan 500 µl *wash buffer* I (*black cap*) ke dalam *filter tube*
- Sentrifugasi pada 8 000 x g selama 15 detik
- Pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*



- o) Tambahkan 500 µl *wash buffer II (blue cap)* ke dalam *filter tube*
- p) Ulangi langkah no. m) sampai dengan no. n)
- q) Tambahkan 300 µl *wash buffer II (blue cap)* ke dalam *filter tube*
- r) Sentrifugasi pada 13 000 x g selama 2 menit
- s) Pisahkan secara hati-hati *filter tube* dari *collection tube* agar *filter tube* tidak bersinggungan dengan larutan hasil sentrifugasi yang mengandung ethanol
- t) Pasangkan *filter tube* dengan *microtube* 1,5 ml steril (*nuclease-free*)
- u) Tambahkan 100 µl *elution buffer* ke dalam *filter tube*
- v) Sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada *microtube* merupakan RNA murni.
- w) Ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi RNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi RNA} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- x) Lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- y) Periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ).
- z) Simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah dalam bentuk *aliquot*.

**CATATAN 1** prosedur metode presipitasi menggunakan kit komersial.

**CATATAN 2** prosedur metode *spin column* menggunakan kit komersial.

**CATATAN 3** ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial lainnya.

## 6.3 Sintesis cDNA dan Amplifikasi

### 6.3.1 Sintesis cDNA

- a) Panaskan RNA hasil ekstraksi (*template*) pada 100 °C selama 5 menit kemudian masukkan ke dalam es.
- b) Buat preparasi *cocktail first strand cDNA synthesis* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji yang dianalisa duplo minimal 5% dari total contoh uji.
- c) Distribusikan 18 µl *cocktail* tersebut pada *microtube* ukuran 0,2 ml.
- d) Masukkan 2 µl *template* RNA (10 ng – 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi (RNA).
- e) Inkubasikan pada 60 °C selama 30 menit.



Tabel 1 – Komposisi *cocktail first strand cDNA synthesis*

No	Nama Bahan	Volume (µl)
1	<i>Random hexamer</i>	1
2	<i>Nuclease free water</i>	10
3	<i>RNase inhibitor</i>	0,5
4	<i>Reverse Transcription buffer</i>	4
5	dNTP	2
6	<i>Reverse transcriptase 20 u/µl</i>	0,5
Total		18
<b>CATATAN 1</b> Protokol di atas menggunakan <i>transcriptor first strand cDNA synthesis kit</i> <b>CATATAN 2</b> Sintesis cDNA juga dapat menggunakan reagen sejenis lainnya sesuai protokol yang dianjurkan		

### 6.3.2 Proses Amplifikasi

- Cairkan cDNA, *primer*, *probe*, PCR *master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es.
- Buat preparasi *cocktail* amplifikasi sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.
- Homogenkan semua bahan *cocktail* amplifikasi dan distribusikan ke masing-masing tabung/ *microplate*/ kapiler PCR optikal.
- Masukkan 5 µl template cDNA contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi; kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10<sup>2</sup> *copies*; 10<sup>3</sup> *copies*; 10<sup>4</sup> *copies*).
- Lakukan amplifikasi dengan *real-time* RT-qPCR, dengan kondisi sesuai Tabel 3.

**CATATAN** seluruh proses preparasi reagen dilakukan pada kondisi dingin.

Tabel 2 – Komposisi *cocktail* amplifikasi *real-time* PCR IMNV

No	Nama Bahan	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	<i>Nuclease-free water</i>	8,5	-
2	<i>Master Mix LC TaqMan master 5x Concentration</i>	4	1 x
3	IMNV412F <i>primer</i> (10 µM)	1	0,5 µM
4	IMNV545R <i>primer</i> (10 µM)	1	0,5 µM
5	IMNVp1 <i>probe</i> (10 µM)	0,5	0,25 µM
Total		15	
<b>CATATAN</b> komposisi <i>cocktail</i> disesuaikan dengan manual kit yang digunakan			

Tabel 3 – Profil Amplifikasi

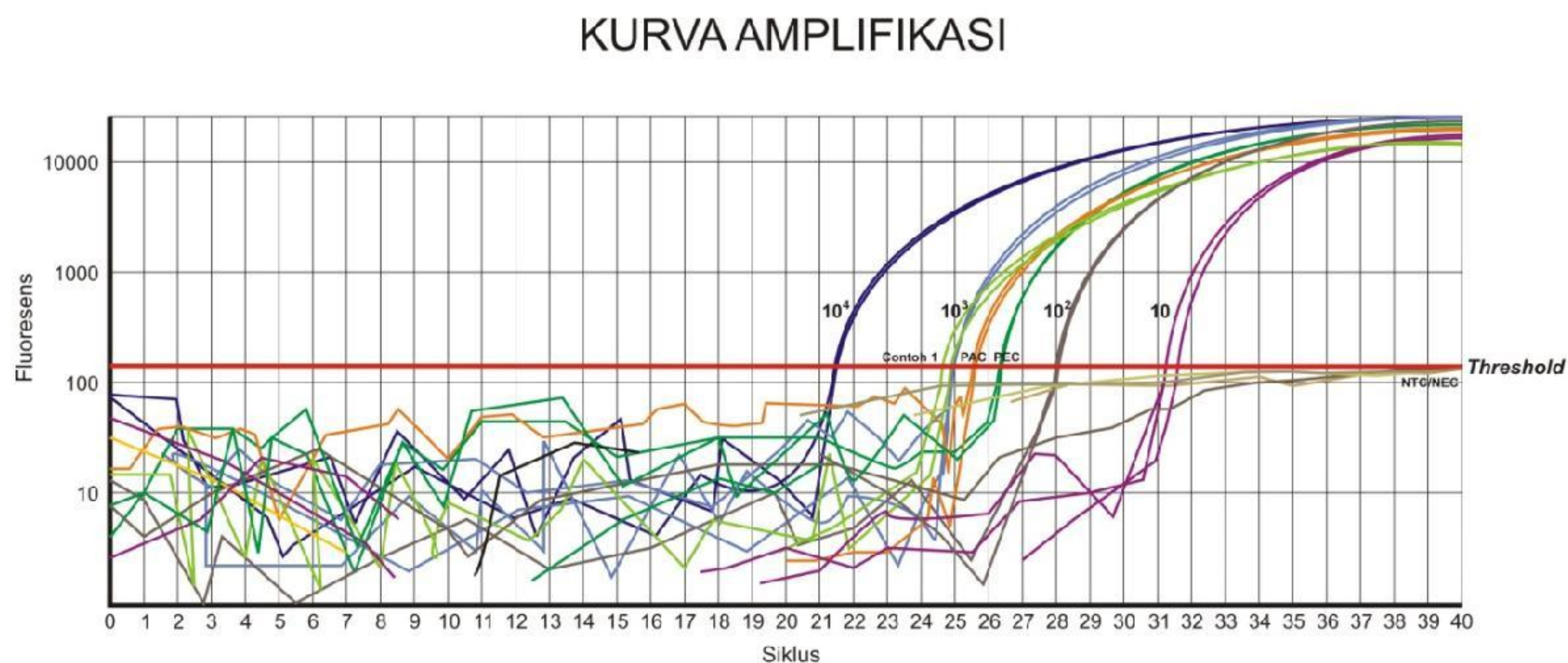
Proses		Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Mode analisis	Mode akuisisi
<i>Hot Start</i>		95	10 menit	1	-	-
Amplifikasi	Denaturasi	95	15 detik	40	Kuantifikasi	-
	<i>Annealing</i> dan Ekstensi	60	1 menit			Single
<i>Cooling</i>		40	30 detik	1	-	-
<b>CATATAN</b> profil amplifikasi disesuaikan dengan manual kit dan mesin <i>real-time</i> PCR yang digunakan						



## 7 Interpretasi hasil

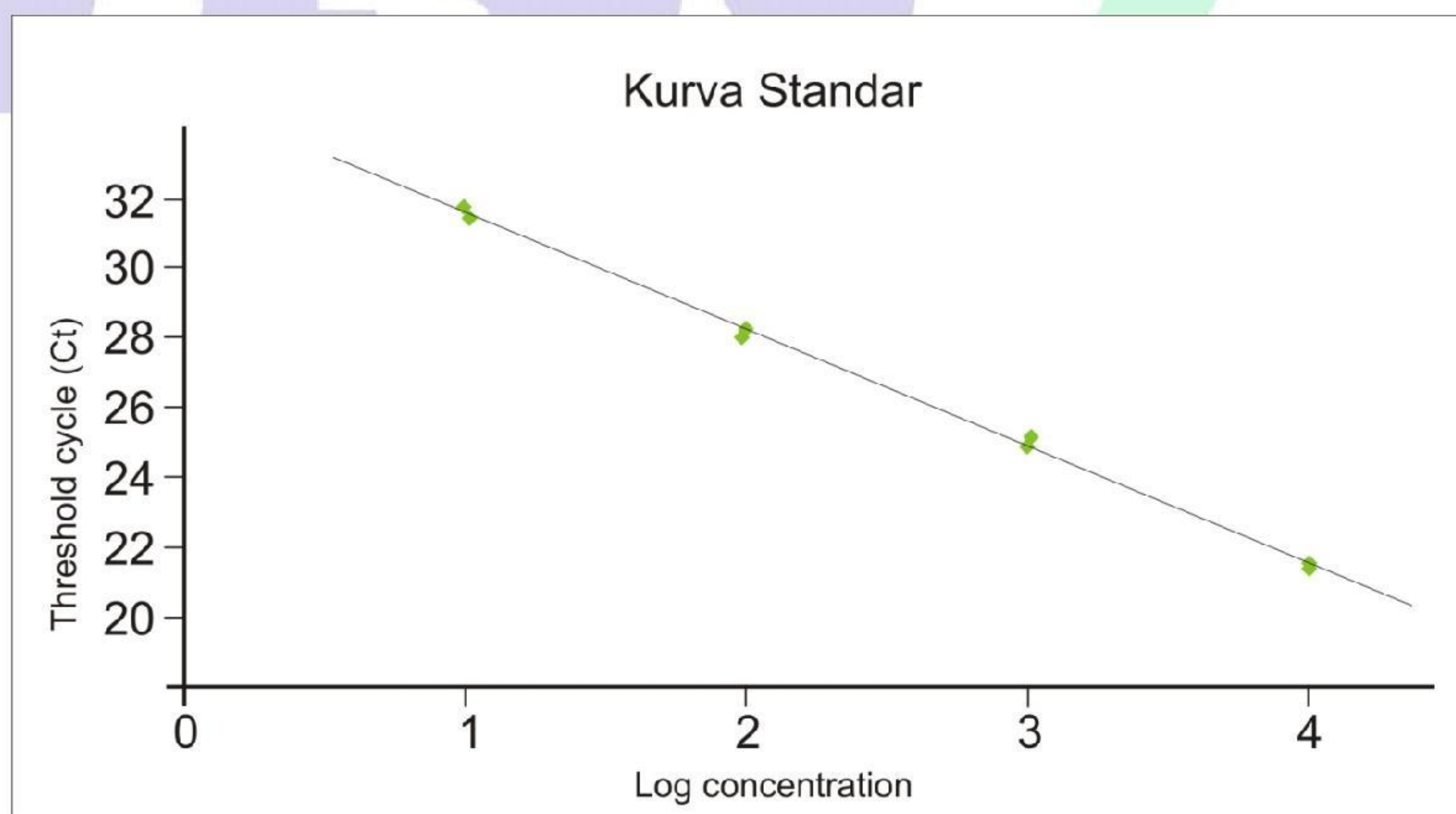
Lakukan analisis data sesuai dengan *software real-time cyclers* yang digunakan.

a) Pengamatan selama proses *real-time* RT-qPCR:



**Gambar 1 – Contoh Kurva Amplifikasi**

Berdasarkan gambar 1, semakin awal naiknya kurva menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin tinggi dan sebaliknya, apabila tidak terjadi kenaikan kurva menunjukkan tidak ada amplifikasi.



**Gambar 2 – Contoh Kurva Standar**

Interpretasi kurva *amplifikasi real-time* PCR adalah sebagai berikut:

- *Threshold/ cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada di atas perpotongan antara *No Template Control* (NTC) dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi.



- Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/ cut off* dan nilai Cq lebih kecil atau sama dengan LOD.
- Contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/ cut off* dan nilai Cq lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

b) Kuantifikasi *copy* virus

Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan. Nilai positif akan terlihat dari nilai konsentrasi pada angka tertentu.

**Tabel 3 - Contoh laporan hasil kuantifikasi *copy* virus**

No.	Nama	Tipe	Cq	Konsentrasi	Standar
1	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
2	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
3	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
4	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
5	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	26.35	6.34E+03	-
6	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	26.47	6.31E+03	-
7	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	25.63	6.52E+03	-
8	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	25.81	6.48E+03	-
9	Standar 10 <sup>1</sup>	Standard	31.72	4.05E+01	6.81E+01
10	Standar 10 <sup>1</sup>	Standard	31.20	4.12E+01	6.81E+01
11	Standar 10 <sup>2</sup>	Standard	28.13	8.45E+02	6.81E+02
12	Standar 10 <sup>2</sup>	Standard	28.17	8.43E+02	6.81E+02
13	Standar 10 <sup>3</sup>	Standard	25.02	6.64E+03	6.81E+03
14	Standar 10 <sup>3</sup>	Standard	25.01	6.68E+03	6.81E+03
15	Standar 10 <sup>4</sup>	Standard	21.58	6.47E+04	6.81E+04
16	Standar 10 <sup>4</sup>	Standard	21.52	6.74E+04	6.81E+04
17	Contoh uji 1	Unknown	24.96	5.15E+03	-
18	Contoh uji 1	Unknown	24.75	5.19E+03	-
19	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-
20	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-

## 8 Jaminan mutu pengujian

- Proses ekstraksi RNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) atau dengan menggunakan *reference gene* dan menunjukkan hasil yang konsisten.
- Hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio  $\hat{A}_{260}/\hat{A}_{280}$  berkisar 1,8 – 2,1.
- Proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) serta menunjukkan hasil yang konsisten.
- Efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai *slope* -3,10 sampai dengan -3,58.
- Proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) > 0,985.
- Keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai Standar Deviasi (SD) Cq < 0,5.



## Bibliografi

Andrade TPD, Srisuvan T, Tang KFJ, Lightner DV. 2007. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus. *Aquaculture* 264 (2007) 9-15.

Nugen. 2011. *Manual Procedure Nugen PCR Detection Kit*.

OIE. 2009. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.6.

Roche. 2004. *LightCycler® TaqMan Master Instruction Manual*.

Roche. 2010. *Manual Procedure of High Pure RNA Tissue Kit*.

